

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370013

研究課題名(和文)細菌界における捕食に対する逃避行動概念の提案

研究課題名(英文) Proposal of the concept of escape behavior from the predators in the bacterial kingdom

研究代表者

松浦 克美 (Matsuura, Katsumi)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：30181689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の細菌は、溶菌酵素を分泌して被食細菌を捕食し育成する。本研究では、世界で初めて細菌で捕食からの逃避行動の存在を提案した。糸状性滑走細菌(*Chloroflexus aggregans*)は、好熱性の酸素非発成型光合成細菌である。本菌は共存細菌が細胞外にプロテアーゼを放出すると、低濃度の時はその反対側に運動した=逃避した。高濃度のプロテアーゼでは「捕食」溶菌されプロテアーゼ分泌菌が育成した。逃避行動時には、本菌から分子量1,500以下の複数のペプチドが放出され、逃避行動に関与していると示唆された。また、逃避に関わる滑走運動機構を解析し、細胞表面の構造体の移動を含む新たな運動機構を提案した。

研究成果の概要(英文)：Certain bacteria secrete lytic enzymes to kill other bacteria for prey. Such bacteria are called predators. In this study, we proposed the existence of an escape behavior from predators in the bacterial kingdom for the first time. The filamentous gliding bacterium (*Chloroflexus aggregans*) is a thermophilic unoxxygenic photosynthesis bacterium. The bacterial cells move away or escape from protease of low concentration, which are secreted from co-existed heterotrophic bacteria. When the concentration of the protease is high, the photosynthetic bacteria are lysed for the prey of the protease-secreting bacteria. When the escape behavior is observed, some peptides of molecular mass of less than 1,500 were released from the photosynthetic bacteria, suggesting that they are involved in the escape behavior. Gliding-motility mechanism for the escape was also studied, and we suggest a cell surface structure moves along the longer axis of the cells with a similar rate of gliding motility.

研究分野：環境微生物学

 キーワード：微生物群集 光合成細菌 *Chloroflexus* 滑走運動 捕食 タンパク質分解酵素 プロテアーゼ 逃避行動

1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌界にも、広い意味での捕食（生きている生物を殺して餌とする）の現象が一部に存在することが知られていた。一方、そのような捕食に対する逃避行動は知られていなかった。我々は、細菌の種間相互作用を研究する中で、他種の分泌するプロテアーゼに反応して、ある細菌が運動速度を上げて凝集することを、2010年に発見した。この細菌は、プロテアーゼ濃度が高いと溶菌しプロテアーゼ産生細菌の餌となると考えられることから、本研究を実施することにより細菌界における捕食に対する逃避行動を示すことができると考えた。

(2) 自然界の土壌や水界中での微生物群集についての研究は、動物や植物に比べ100年以上遅れているとも言える。これは、ごく一部の微生物のみしか検出同定できないことが要因であった。近年、微生物を単離せずにゲノムの配列決定から、微生物の種類と量、およびその変動を解析できるようになり、自然界の微生物群集の研究が本格的に始まった。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、細菌にも捕食に対する逃避行動が存在することを示すことを目的とした。

(2) 本研究の全体構想では、申請者が30年以上にわたり取り組んできた、光合成細菌の生化学・生物物理学、分子生物学、進化生物学の成果と経験を、微生物生態学の分野に適用することにより、微生物間の種間関係を捕食と逃避行動に着想して進めた。特に、「プロテアーゼを分泌して生細胞を餌とする細菌と、プロテアーゼを感じて逃避行動をする細菌が存在する」という仮説を立て検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 速い滑走運動を行う光合成細菌と、滑走運動を促進する細菌は、中房温泉の65°C微生物マットから単離した。

共存細菌から分泌されるプロテアーゼが運動促進物質である結果を踏まえて、プロテアーゼの分泌量と運動促進効果を定量的に明らかにした。また、プロテアーゼ活性と溶菌速度の関係も明らかにした。これにより「プロテアーゼと細胞運動に基づく細菌界における捕食と逃避行動の概念」の提案を目指した。

(2) 逃避運動を測定するために、定量性に優れた滑走運動測定系を、構築した。低濃度の観点中に、重層的にプロテアーゼ層、細菌層、寒天のみの層を作成することにより、これを達成した。分光高度計内で、細いスリットと微動装置を作成し、高い精度での測定を実現した。合わせて、培地条件、光条件、温度条件等も検討した。

寒天平板培養での逃避運動測定系の構築も試みた。ただし、軟寒天中の結果に匹敵する定量的結果は得られなかった。

(3) 光合成細菌アグリガンスとプロテアーゼ産生細菌のコロニーを同時に寒天平板上で形成させる培養条件を構築した。条件を制御してプロテアーゼ産生細菌がアグリガンを餌として成育する条件を決定した。その条件で、2種細菌の同時培養条件からの相互作用を試験した。

(4) 光合成細菌アグリガンスの滑走運動の機構を解明するために、走査顕微鏡、透過型電子顕微鏡、高速原子間力顕微鏡を用いて、細胞の表面構造を解析した。

さらに、細胞表面の運動を直接観察するために、微小ガラスピースを表面に付着させ、その動きを光学顕微鏡で観察した。動きのビデオ測定を行い、動きの速度を測定した。

光学顕微鏡下で、多数の滑走運動を観察し、方向変換の速度分布を測定した。その結果を説明するモデルを考案し、コンピュータシミュレーションで、モデルの妥当性を検証した。

(5) 光合成細菌アグリガンスの逃避行動メカニズムを解明するために、プロテアーゼ存在下で細胞外に遊離する成分の中で、滑走運動促進効果のある成分の特定を進めた。低分子画分に促進効果があったので、その分子量と性質を調べた。

(6) 以上の研究をとりまとめ、プロテアーゼの分泌による捕食とプロテアーゼの感知による逃避行動について、「細菌界における逃避行動の概念」として示すことを目指した。

4. 研究成果

(1) 緑色糸状性光合成細菌の滑走運動に対する共存細菌の促進作用

緑色糸状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* は温泉流水中に発達する微生物マットの主要構成種のひとつであり、光照射下において滑走運動により集合体を形成するという性質が知られていた(図1)。その集合体形成は、共存細菌によって影響を受けた。55°C域の微生物マットから分離した好気従属細菌の培養上清を調製して、*C. aggregans* の集合体形成に与える影響を評価したところ、凝集促進作用が確認された(図2)。培養上清の促進効果は、熱処理やプロテアーゼ阻害剤によって抑制されることなど等から、菌体外プロテアーゼが、その促進因子であると結論した。分離した株のひとつは *Bacillus licheniformis* に近縁であったため、*B. licheniformis* 由来の市販精製プロテアーゼを用いて試験したところ、低濃度のプロテアーゼによる集合体形成促進効果を確認することができた。

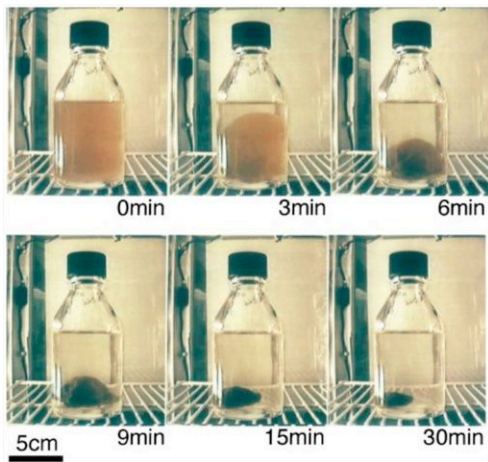


図1. 滑走運動による細菌細胞の凝集

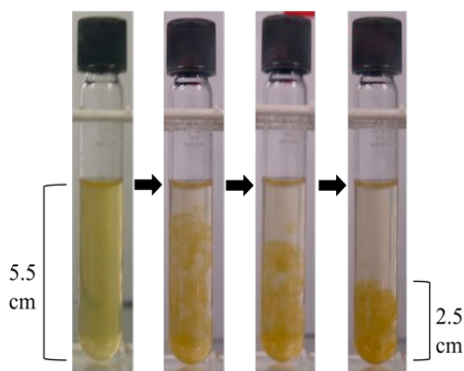


図2. 共存細菌の上清添加による凝集の促進

一方、添加するプロテアーゼ濃度が高くなると *C. aggregans* の溶菌を引き起こしたことから、従属栄養細菌がプロテアーゼによって光合成細菌から有機物を獲得しており、それに対抗して *C. aggregans* は滑走によって忌避運動している可能性が考えられた。

(2) プロテアーゼ産生細菌による光合成細菌の溶菌とそれに依存した成育

次に、滑走運動を促進するプロテアーゼ産生菌が *C. aggregans* に依存して生育するかどうかを検証した。炭素源の代わりに *C. aggregans* の菌体を混釈した寒天平板培地を作成し、単離株を塗布して、65°C、暗所・好気条件で培養した。プロテアーゼ産生株では、コロニー形成が見られたが、菌体外プロテアーゼ活性を持たない株では生育が見られなかった(図3)。 *C. aggregans* が優占する微生物マットには多様な従属栄養細菌が共存しており、それらは *C. aggregans* の菌体成分を炭素源として生育していると考えられた。つまりプロテアーゼ産生細菌が捕食者と考えられた。

(3) 緑色糸状性光合成細菌のプロテアーゼ産生細菌からの逃避行動

C. aggregans の滑走運動による集合体形成がプロテアーゼ存在下で促進されたことから、プロテアーゼが方向性のある逃避行動を

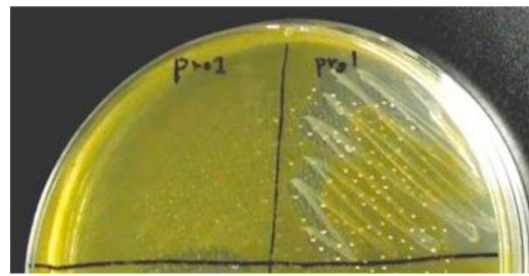


図3. プロテアーゼ産生菌によるコロニー形成(右)と非生産菌による非形成(左)

誘発しているという仮説を設定した。その仮説を検証するために、プロテアーゼが滑走運動の方向性に影響を与えるかどうかを調べた。 *C. aggregans* の細胞を軟寒天培地に懸濁して試験管に入れ、その上からプロテアーゼを含む軟寒天培地を重層した。55°C、光照射下で保温したところ、プロテアーゼ層に近い部分の *C. aggregans* の細胞密度が減少し、プロテアーゼ層から離れた部分の細胞密度が上昇した(図4)。プロテアーゼを添加しない系では、この現象は見られなかった。この結果から、 *C. aggregans* はプロテアーゼを感知し、反対方向に移動すると結論した。

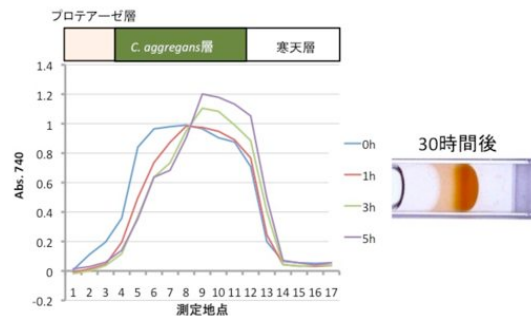


図4. プロテアーゼからの細菌細胞の逃避

本結果により、プロテアーゼに対する逃避行動が存在することがわかった。細菌界において捕食に対する逃避行動を示した初めての例である。

さらに *C. aggregans* 細胞の運動を顕微鏡観察したところ、プロテアーゼを添加することで方向転換の頻度が上昇する様子が観察された。このような方向転換頻度の上昇が、逃避行動に直接関係する可能性が考えられた。

(4) 緑色糸状性光合成細菌 *Chloroflexus aggregans* の滑走運動機構

C. aggregans は、約 3 μm の細胞が直列につながった糸状体を形成している。糸状体は長軸方向に、物体表面を滑るように動く滑走運動を行う。逃避行動を詳細に検討する為に、滑走運動機構の解明にとりくんだ。これまでの研究で、この運動は、酸素濃度や光によって影響を受けることを見出していた。そこでまず、細胞表面の運動器官の探索を行った。 *C. aggregans* のゲノム情報を解析したとこ

る, IV型線毛に関すると思われる遺伝子が見出された. 本菌の細胞を液体窒素で瞬間凍結させて走査型電子顕微鏡で観察したところ, 細胞表面の一部に直径 3 nm 程度の構造体が見出された.

ネガティブ染色および急速凍結レプリカ法を用いて電子顕微鏡観察したところ, 平均直径17.8 nmの繊維状の構造体が菌体表面から伸びていることが確認できた. 一細胞あたり数本の繊維が観察され, 10 μm以上になる長い繊維も見られた. この繊維は細胞間隙の近傍に局在している傾向があった.

細胞表面構造を高速原子間力顕微鏡を用いて観察したところ, 糸状体の長軸に沿った複数の筋状構造を見出すことができた.

次いで, 細胞懸濁液に微小ガラスビーズ(直径約1 μm)を添加し, 55°Cに加温したステージを持つ光学顕微鏡で観察した. 細胞表面に付着したガラスビーズが, 糸状体の滑走運動と同程度の速さで, 細胞に沿って動く様子が観察された(図5). 付着したガラスビーズは, 3 μm程度進んでは, その進行方向を反転させることを繰り返したことから, この動きは糸状体を構成する各細胞での動きと考えられた. またそれぞれの細胞間の動きは必ずしも同調しているわけではなく, 同一糸状体中に付着した異なるガラスビーズが, 同時に別の方向に移動する様子も観察された.

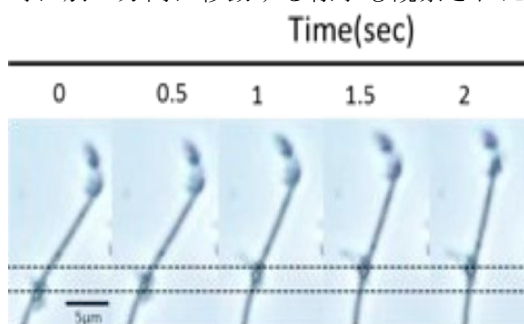


図5. 細胞表面に付着したガラスビーズの動き

次に, 55°C, 光照射条件下で, 様々な長さの糸状体の運動を顕微鏡観察し, 方向反転頻度と糸状体長の関係を調べた. 長さ 100 μm 以上の糸状体では, 10 分間あたりの方向転換回

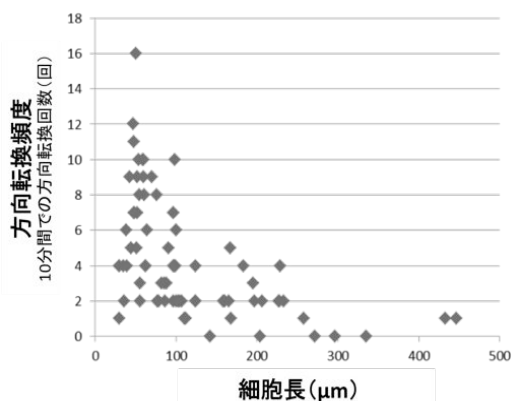


図6. 連続した細胞全体の長さ方向転換速度

数が0-5回であったのに対し, 100 μm以下の糸状体では回数に幅があり, 1回のものから多いものでは16回であった(図6).

これらの結果から, 糸状体中の各細胞の状態と糸状体全体の運動方向との関係についてモデルを立て, モンテカルロ法を用いたシミュレーションを行った. ここで各細胞の動きの状態(向きと静止)は確率的に決定するものとした. その結果, 次のモデルが, 上述の実験結果とよく一致した. 「糸状体が静止時には細胞の運動方向の総和が糸状体の運動方向を決定するが, 一度, 動き出すと, 滑走方向と逆向きの細胞運動は滑走に影響せず, すべての細胞が停止する, または, 逆向きの動きをするまでは静止しない.」

この実験結果とよく一致したモデルの提案により, これまで全く不明であった糸状性細菌の滑走運動の運動器官と方向決定機構の有力な仮説が示された.

(5) 外来性プロテアーゼによる緑色糸状性光合成細菌の逃避行道促進メカニズム

*Bacillus licheniformis*由来のプロテアーゼを用いて, *C. aggregans*の細胞を55°C, 100分間処理しても, 多くの細胞は形態を維持していることを確認した. 反応液から遠心分離と限外濾過により細胞および添加したプロテアーゼを除去し, 低分子化合物を含む画分を得た. この画分にも細胞凝集性促進効果が検出され, その効果は100°C, 10分の熱処理でも失われなかった. さらに, ゲルろ過クロマトグラフィーで分画し, 得た活性画分をSDS-PAGEで解析したところ, 分子量3,000以下に複数のペプチドバンドが検出された. 一方, *C. aggregans*の細胞を超音波で破碎した液には細胞凝集促進作用は見られなかった. これらの結果から, *C. aggregans*細胞のプロテアーゼ処理後に出現した低分子物質に, 細胞凝集促進作用があると考えられた.

凝集体形成促進作用は, 得られた低分子物質のキモトリプシン処理により抑制された. 低分子量画分を, 逆相クロマトグラフィーで分画し, 活性画分をSDS-PAGEで解析したところ, 分子量1,500以下に複数のペプチドバンドが検出された. また, 暗所・嫌気条件下でプロテアーゼ処理して回収した低分子量画分の凝集体形成作用は低かった. 以上の結果から *C. aggregans* はプロテアーゼに反応して低分子のペプチドを分泌し, 凝集体形成を誘導している可能性が考えられた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Fukushima, S., S. Morohoshi, S. Hanada, K. Matsuura and S. Haruta. Gliding motility driven by individual cell-surface movements in a

multicellular filamentous bacterium *Chloroflexus aggregans*. *FEMS Microbiology Letters*, in press (2016)
DOI:<http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnw056>

- ② Morohoshi, S., K. Matsuura and S. Haruta. Secreted protease mediates interspecies interaction and promotes cell aggregation of the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aggregans*. *FEMS Microbiology Letters* 362:1-5 (2015)
DOI:<http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnu046>

[学会発表] (計 16 件)

- ① Nishihara, A., M. Kojima, K. Matsuura and S. Haruta. A trial of isolation of thermophilic aerobic nitrogen-fixing bacteria from hot springs. 19th International Congress on Nitrogen Fixation. (Pacific Grove, USA) (October 4, 2015)
- ② Kamiya, N., K. Matsuura and S. Haruta. Sulfur disproportionation is achieved by co-metabolism with photosynthetic sulfide oxidation to sulfur. EMBO Workshop on Microbial sulfur metabolism (Helsingør, Denmark) (April 12, 2015)
- ③ Haruta, S., N. Kamiya, S. Morohoshi, K. Matsuura and H. Otaki. Cyclic electron flow through interspecies interactions determines development of photosynthesis-based microbial ecosystems. 1st ASM Conference on Mechanisms of Interbacterial Competition and Cooperation (Washington D. C., USA) (March 13, 2015)
- ④ 神谷直毅、松浦克美、春田伸「緑色糸状性光合成細菌が優占する温泉微生物群集における硫化水素の嫌気的な硫酸への酸化」環境微生物系学会合同大会 2014 (浜松) (2014 年 10 月 21 日)
- ⑤ Morohoshi, S., K. Matsuura and S. Haruta. Exogenous protease released signal promoting cell aggregation of a thermophilic filamentous bacterium. 5th ASM Conference on Cell-Cell Communication in Bacteria (San Antonio, USA) (October 18, 2014)
- ⑥ 諸星聖、加藤紗織、松浦克美、春田伸「プロテアーゼ生産菌による捕食的溶解と被食細菌の逃避行動」第 61 回日本生態学会大会 (広島) (2014 年 3 月 14 日)
- ⑦ 坂庭眞吾、諸星聖、松浦克美、春田伸「緑色糸状細菌 *Chloroflexus aggregans* の増殖限界温度を超えた高温耐性について」第 29 回日本微生物生態学会 (鹿児島) (2013 年 11 月 24 日)

- ⑧ 大滝宏代、松浦克美、春田伸「温泉パイオマットにおける S0 還元活性と硫黄循環」第 29 回日本微生物生態学会 (鹿児島) (2013 年 11 月 24 日)
- ⑨ 諸星聖、松浦克美、春田伸「糸状性滑走細菌の外來性プロテアーゼによる細胞凝集性促進メカニズム」第 29 回日本微生物生態学会 (鹿児島) (2013 年 11 月 24 日)
- ⑩ Fukushima, S., K. Matsuura, and S. Haruta. Anoxygenic photosynthetic bacterium, *Chloroflexus aggregans* migrates to the boundary between anaerobic and microaerobic environments. 5th TKJ International Symposium on Microbial Ecology (Johngli, Taiwan) (October 31, 2013)
- ⑪ 諸星聖、松浦克美、春田伸「細菌界における捕食に対する逃避行動：糸状性光合成細菌の滑走運動について」日本生態学会第 60 回大会 (静岡) (2013 年 3 月 6 日)
- ⑫ 大滝宏代、岩田聡実、春田伸、松浦克美「Cyclic electron flow in hot spring microbial mats is driven by anoxygenic phototrophic bacterium」第 28 回日本微生物生態学会 (豊橋) (2012 年 9 月 19 日)
- ⑬ 岩田聡実、大滝宏代、花田智、松浦克美、春田伸「Autotrophic growth of anoxygenic phototroph, *Chloroflexus aggregans*, supported by a heterotroph」第 28 回日本微生物生態学会 (豊橋) (2012 年 9 月 19 日)
- ⑭ 福島俊一、大滝宏代、松浦克美、春田伸「Illumination changed the response to oxygen of a facultative anaerobic photosynthetic bacterium, *Chloroflexus aggregans*」第 28 回日本微生物生態学会 (豊橋) (2012 年 9 月 19 日)
- ⑮ Morohoshi, S., K. Matsuura, and S. Haruta. Exogenous protease promoted cell aggregation of a filamentous bacterium *Chloroflexus aggregans*. 14th International Symposium on Microbial Ecology (Copenhagen, Denmark) (August 19, 2012)
- ⑯ Iwata, S., H. Otaki, S. Hanada, K. Matsuura, and S. Haruta. Photoautotrophic growth of *Chloroflexus aggregans* in an enrichment culture derived from hot spring microbial mats. 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (Porto, Portugal) (August 5, 2012)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=envmic>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 克美 (MATSUURA, Katsumi)
首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号：3 0 1 8 1 6 8 9

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

春田 伸 (HARUTA, Shin)
首都大学東京・理工学研究科・准教授
研究者番号：5 0 3 5 9 6 4 2

(4) 協力研究者

花田 智 (HANADA, Satoshi)
首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号：1 0 3 5 7 7 9 1

諸星 聖 (MOROHOSHI, Sho)
首都大学東京・理工学研究科・客員研究員

福島 俊一 (FUKUSHIMA, Shunichi)
首都大学東京・理工学研究科・大学院生